

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 juillet 2001 (12.07.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/49821 A2

-
- (51) Classification internationale des brevets⁷:** C12N
- (21) Numéro de la demande internationale:** PCT/FR00/03708
- (22) Date de dépôt international:** 28 décembre 2000 (28.12.2000)
- (25) Langue de dépôt:** français
- (26) Langue de publication:** français
- (30) Données relatives à la priorité:**
99/16716 30 décembre 1999 (30.12.1999) FR
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US):**
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; Fondation reconnue d'utilité publique, 1, rue du Professeur Calmette, F-59000 Lille (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). SOCIETE D'ETUDE ET DE DEVELOPPEMENT DES ANTIGENES COMBINATOIRES - SEDAC THERAPEUTICS [FR/FR]; Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, F-59000 Lille (FR).
- (72) Inventeurs; et**
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement):** PANCRE, Véronique [FR/FR]; 6, rue Marcel Delormez, F-59310 Orchies (FR). GRAS-MASSE, Hélène [FR/FR]; 321,

rue de la Rosière, F-59170 Mérignies (FR). BOUZIDI, Ahmed [FR/FR]; 680, avenue de l'Europe, F-59112 Annoeullin (FR). HACHULLA, Eric [FR/FR]; 244, rue du Général de Gaulle, F-59139 Wattignies (FR). AURIAULT, Claude [FR/FR]; 60, rue Louis Guislain, F-59310 Nomain (FR).

(74) Mandataires: LHUILLIER, René etc.; Cabinet Lepedury, 43, rue de la Brèche aux Loups, F-75012 Paris (FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: TH1 SPECIFIC CD4 T CELL LINES AND METHOD FOR INDUCING THEM EX VIVO

(54) Titre: LIGNEES DES LYMPHOCYTES T CD4 SPECIFIQUES DE TYPE TH1 ET PROCEDE POUR LEUR INDUCTION EX VIVO

WO 01/49821 A2

(57) Abstract: A TH1 specific CD4 T cell line, inducing an efficient CD8 response against an infection caused by an infectious agent, is obtained by removing from a donor a biological sample containing T cells; isolating the CD4⁺ T cells from said sample; simultaneously providing dendritic cells isolated from the same sample or another sample derived from the same donor; subjecting the previously isolated CD4⁺ T cells to *in vitro* immunisation with a peptide of a protein of the infectious agent exhibiting at least a T epitope, in the presence of the previously obtained dendritic cells; performing at least a restimulation, in the same conditions as for immunisation, optionally substituting the dendritic cells with B cells from the same donor.

(57) Abrégé: On obtient une lignée de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1, induisant une réponse CD8 efficace contre une infection provoquée par un agent infectieux, en prélevant sur un donneur un échantillon biologique contenant des lymphocytes T; isolant les lymphocytes T CD4⁺ à partir de cet échantillon; parallèlement se procurant des cellules dendritiques isolées à partir du même échantillon ou d'un autre échantillon provenant du même donneur; soumettant les lymphocytes T CD4⁺ isolées précédemment à une immunisation *in vitro* avec un peptide d'une protéine de l'agent infectieux présentant au moins un épitope T, en présence des cellules dendritiques obtenues précédemment; effectuant au moins une restimulation, dans les mêmes conditions que l'immunisation, avec remplacement éventuel des cellules dendritiques par des cellules B du même donneur.

Lignées des lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 et procédé pour leur induction ex vivo.

L'invention concerne l'obtention ex vivo de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1.

Elle a plus particulièrement pour objets de tels lymphocytes et un procédé pour leur obtention par induction 5 ex vivo de lignées de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 dans un but immunoprophylactique ou thérapeutique vis-à-vis d'infections provoquées par un agent infectieux tel qu'un virus, une bactérie ou un parasite.

Le contexte dans lequel se situe l'invention est 10 explicité ci-après en référence avec l'infection par le Virus de l'Immunodéficiency Humaine (VIH) qui mobilise de nombreux chercheurs depuis une quinzaine d'années, ce qui permet de disposer d'un volume important de données.

L'infection par le VIH se caractérise par une 15 hyperactivité chronique du système immunitaire qui contraste avec un déficit de nombreuses fonctions des cellules du système immunitaire. Idéalement, la vaccination contre le VIH doit permettre de transformer l'infection chronique en infection aiguë, ceci en amplifiant et en accélérant la 20 réponse immunitaire naturelle. A ce jour, la recherche vaccinale sur le VIH s'est principalement orientée vers deux axes : d'une part, l'induction d'une réponse humorale médiée par des anticorps neutralisant le virus et, d'autre part, l'induction d'une immunité à médiation cellulaire.

Bien que des expériences de neutralisation aient 25 permis d'observer des résultats positifs en termes de protection, l'utilisation exclusive d'anticorps neutralisants dans une optique vaccinale apparaît peu applicable en raison d'importantes limitations telles que la 30 restriction à des isolats viraux minoritaires ainsi qu'une concentration d'anticorps requise très élevée.

En revanche, les informations issues des recherches concernant les composantes cellulaires de la

réponse immunitaire anti-VIH sont plus encourageantes. En effet, les données relatives à l'activité cytotoxique médiée par les lymphocytes T8 supresseurs cytotoxiques qui expriment le marqueur CD8, appelés ci-après lymphocytes T CD8 [lymphocytes T cytotoxiques (Cytotoxic T Lymphocytes ou CTL)] révèlent une corrélation entre l'apparition de cette activité et le contrôle de l'infection virale. Des lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre des séquences dérivées de protéines virales apparaissent très rapidement lors de la réponse immune déclenchée par l'infection virale. D'une manière générale, ils jouent un rôle important en éliminant les cellules infectées par le virus dans les infections aiguës et en bloquant la réPLICATION virale lors d'infections persistantes. Ces réponses cytotoxiques, tout comme l'induction d'anticorps neutralisants, sont étroitement associées aux réponses dites T auxiliaires connues sous la dénomination "T helper" (en abrégé TH) médiées par les lymphocytes T4 qui expriment le marqueur CD4, appelés ci-après lymphocytes T CD4. Ainsi, une augmentation de la réponse TH permet d'obtenir une réponse CTL optimale. En particulier, chez les individus qui contrôlent la virémie en l'absence d'une thérapie antivirale, de très fortes réponses prolifératives des lymphocytes T CD4 spécifiques du virus sont observées. Dans tous les cas, il apparaît clairement établi qu'une nette réponse CD4 est indispensable pour l'obtention d'une réponse CD8 efficace. Ainsi, dans le cadre d'une approche vaccinale, il importe désormais de préciser la nature de la réponse CD4 obtenue. Une réponse de type TH1 (IFN- γ , IL-2) ou de type TH2 (IL-4) n'a pas la même signification car l'on peut craindre que dans le deuxième cas, elle soit par exemple plus nuisible qu'utile à la vaccination, et l'ensemble des travaux réalisés jusqu'à présent démontrent clairement l'importance des cellules TH1 productrices d'IFN- γ dans l'immunité protectrice anti-VIH. Mais l'orientation vers un type ou l'autre de réponse est très difficilement contrôlable après injection d'un antigène à un individu, en

fonction du polymorphisme génétique exprimé par ce dernier.

La demande de brevet WO 94/02156 (PCT/US93/06653) déposée le 15 juillet 1993 et qui revendique une priorité du 16 juillet 1992, concerne des procédés utilisant des 5 cellules dendritiques pour activer des cellules T. Ces procédés sont basés sur les connaissances qui étaient disponibles à cette époque en ce qui concerne les composantes cellulaires de la réponse immunitaire, notamment anti-VIH.

10 Dans cette demande, les auteurs proposent un protocole de purification de cellules dendritiques à des fins de thérapie cellulaire. Ces cellules dendritiques sont directement pulsées par un antigène, pour activer et expandre des cellules T (CD4 et CD8) spécifiques. Ce 15 protocole nécessite plusieurs étapes d'isolement pour obtenir une pureté de 80 à 90 % des cellules dendritiques.

Les auteurs rapportent des expériences d'immunisation *in vitro* de cellules T autologues par des cellules dendritiques "exposées" à la KLH (Keyhole Limpet 20 Hemocyanine : hémocyanine de lamproie) ou à la SWM (Sperm Whale Myoglobin : myoglobine de cachalot). Ils n'abordent ni l'orientation de la réponse T CD4 induite dans ces expériences, ni la question du génotype HLA du donneur. L'activation des cellules est caractérisée uniquement sur la 25 base d'une réponse proliférative et les auteurs semblent prévoir une expansion à long terme (6 à 8 semaines) des cellules T CD4 (ou T CD8) avant de les utiliser dans des protocoles de thérapie cellulaire.

Dans le cas particulier de l'infection par le 30 VIH, les auteurs utilisent un peptide de la protéine gag de VIH pour des immunisations *in vitro* de cellules T autologues de donneurs séronégatifs. Ils ne s'intéressent qu'à l'induction d'une réponse CD8 spécifique qu'ils se proposent d'utiliser dans le cadre d'une thérapie cellulaire 35 adoptive :

- dans les stades tardifs de la maladie, par transfert de cellules T CD8 de sujets sains HLA compatibles,

- dans les stades précoce de la maladie, par transfert de cellules T CD8 autologues (après réactivation *ex vivo*) ou de sujets sains HLA compatibles.

En conclusion, la demande de brevet WO 94/02156, 5 dans le cas particulier de l'infection par le VIH, constitue une approche pour l'obtention d'une réponse CD8. Elle n'expose toutefois pas les moyens permettant d'induire une réponse CD4 TH1 (plus particulièrement génératrice d'une production d'IFN- γ) spécifique, permettant une protection 10 contre des désordres infectieux et ceci quel que soit le génotype HLA du donneur. De plus, les procédés et protocoles décrits ou prévus dans cette demande sont fastidieux ou longs (purification des cellules dendritiques en plusieurs étapes, expansion sur 6 à 8 semaines des cultures de 15 cellules CD4 ou CD8).

La présente invention reméde à ces lacunes et inconvénients.

Selon un premier aspect, elle a pour objet une lignée de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 20 induisant, de manière efficace, des lymphocytes T cytotoxiques, c'est-à-dire une réponse CD8 efficace, contre une infection provoquée par un agent infectieux comme par exemple un virus, une bactérie ou un parasite.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet 25 un procédé permettant d'induire *ex vivo*, de façon standardisée, une telle lignée.

Plus précisément, l'invention a également pour objet un procédé d'induction *ex vivo* d'une lignée de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 telle que définie 30 ci-dessus, lequel procédé comprend essentiellement les étapes consistant à :

- a) prélever sur un donneur un échantillon biologique contenant des lymphocytes T ;
- b) isoler les lymphocytes T CD4⁺ à partir de l'échantillon 35 prélevé à l'étape a) ; parallèlement
- c) se procurer des cellules dendritiques isolées à partir du même échantillon ou d'un autre échantillon provenant

- du même donneur ;
- d) soumettre les lymphocytes T CD4⁺ isolés à l'étape b) à une réaction immunologique ou immunisation *in vitro* avec un peptide d'une protéine de l'agent infectieux présentant au moins un épitope T, de préférence un épitope T et un épitope B, en présence des cellules dendritiques de l'étape c) ;
- e) effectuer au moins une restimulation, de préférence de une à trois restimulations, dans les mêmes conditions que l'immunisation, en remplaçant éventuellement les cellules dendritiques par des cellules B du même donneur.

On entend ici par "peptide d'une protéine de l'agent infectieux" un peptide dont la séquence est identique à celle de la fraction correspondante de ladite protéine ou est modifiée par apport d'une partie lipidique ou par induction d'une dégénérescence contrôlée chimiquement, dans une mesure telle que sa fonction soit maintenue, ou un mélange d'au moins deux peptides tels que définis ci-dessus.

Selon ce procédé, des lymphocytes T CD4⁺, isolés dans une étape précédente, sont soumis directement à une réaction immunologique ou immunisation *in vitro* avec un peptide d'une protéine de l'agent infectieux à combattre, en présence de cellules dendritiques préalablement isolées.

Ce procédé peut être mis en oeuvre sur tout échantillon biologique humain ou animal contenant des lymphocytes T. Il présente, a priori, un intérêt particulier dans ses applications à l'être humain. Dans ce cas, pour des raisons déontologiques et pratiques évidentes, l'échantillon biologique utilisé est de préférence le sang et, pour les applications de type immunoprophylactique ou thérapeutique, il s'agit de sang autologue.

L'aptitude de ce procédé à induire des lignées de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 nécessaires à la génération de CTL a, comme le montrent les exemples décrits plus loin, été vérifiée sur différents agents pathogènes.

Dans le cas particulier du VIH, les lignées de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 nécessaires à la génération de CTL peuvent être réinjectées dans des protocoles de thérapie cellulaire anti-VIH. Les patients traités peuvent être notamment des patients séropositifs en phase asymptomatique à taux de cellules T CD4 encore intact ou des patients en cours de renouvellement cellulaire sous thérapie antivirale à haute efficacité (Highly Active AntiRetroviral Therapy (HAART)). En effet, chez ces derniers, si on constate une nette et rapide diminution de la virémie, le virus n'est pas éradiqué et malgré une restauration du taux de cellules T CD4 et de la réponse immunitaire globale (lutte contre les infections opportunistes associées), on n'observe pas de réapparition de la réponse TH1 spécifique contre le VIH, qui est nécessaire à l'élimination de ce dernier. Les lignées de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 obtenues *ex vivo* selon l'invention peuvent donc être utilisées en complément à une HAART, par exemple une trithérapie, pour la restauration du potentiel TH1.

Il va de soi que pour des infections provoquées par d'autres agents infectieux, le protocole d'utilisation peut être différent. Les lignées peuvent notamment, dans certains cas, être utilisées seules, c'est-à-dire ne pas servir de complément à une thérapie, par exemple lorsqu'il s'agit d'effectuer la vaccination d'un sujet sain.

Dans toutes ces applications, les lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 selon l'invention sont des cellules autologues dont le transfert est capable d'induire une réponse CD8 efficace *in vivo*, sans apport de cellules CD8.

Les exemples illustratifs qui suivent sont destinés à mieux expliquer l'invention.

Exemple 1 : Préparation d'une lignée de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1, anti-VIH et résultats

1- Préparation.

5 Dans cet exemple, l'inducteur est le peptide 56-68 de la protéine Nef (Negative Factor) de 27 kDa qui est une protéine de régulation du VIH décrite initialement comme ayant un effet inhibiteur sur la réPLICATION virale *in vitro*. Le gène Nef est localisé en 3' du gène Env de VIH.
10 Références : "The HIV Nef protein : facts and hypotheses", Guy, B. et al., Res. Virol., janv-fév. 1992, 143(1), 34-37 et "Virological and cellular physiological roles of HIV Nef protein", Venkatesan, S., Res. Virol. jan-fév 1992, 143(1), 38-42.

15 La séquence de la protéine Nef est décrite dans : "Complete nucleotide sequence of AIDS virus, HTLV-III", Ratner, L. et al., Nature 1985, 313, 277-284.

La séquence du peptide 56-68 de la protéine Nef du VIH est

20



Ce peptide contient à la fois un épitope T et un épitope B.

25 Références : "T helper cell epitopes of the human immunodeficiency virus (HIV-1) nef protein in rats and chimpanzees", Estaquier et al., Mol. Immunol. avril 1992, 29(4), 489-99, "Determination of B-cell epitopes of nef HIV-1 protein : immunogenicity related to their structure",
30 Estaquier et al., Mol. Immunol. nov 1992, 29(11), 1337-45 et "Comprehensive delineation of antigenic and immunogenic properties of peptides derived from the nef HIV-1 regulatory protein", Estaquier et al., Vaccine 1993, 11(11), 1083-93.

Le milieu biologique utilisé est le sang humain périphérique. Les échantillons (100 à 150 ml) répertoriés dans le tableau qui suit provenaient de différents donneurs typés pour les molécules de la classe II du complexe majeur

d'histocompatibilité (CMH), en particulier HLA-DR.

Le sang total, dilué au demi dans du tampon phosphate (PBS) est déposé sur une solution pour gradient, spécifique de l'isolement des cellules mononucléées du sang périphérique humain, Ficoll-Paque® Amersham Pharmacia Biotech (Suède), selon les recommandations du fabricant et l'anneau de cellules mononucléées est récupéré après centrifugation (400 g, 20 min, 20°C).

Les monocytes sanguins CD14⁺ sont isolés par sélection positive (Système Macs, Milteny Biotech, Allemagne). Les cellules dendritiques sont ensuite obtenues à une pureté de 80 à 90 % au moins, en une seule étape, par différenciation *in vitro* de ces cellules CD14⁺ mises en présence d'IL-4 (1000 U/ml) et de GM-CSF (800 U/ml) pendant cinq jours en milieu complet à 10 % de sérum de veau foetal (SVF). Les cellules CD14⁻ sont de leur côté conservées en milieu complet à 10 % de sérum humain de groupe AB⁺ pendant également cinq jours.

Au bout de ces cinq jours, les lymphocytes T CD4⁺ sont isolés par déplétion ou sélection négative (Système Macs, Milteny Biotech) à partir des cellules CD14⁻ obtenues précédemment.

Les lymphocytes T CD4⁺ (1.10^6 /ml) sont ensuite immunisés *in vitro* par le peptide 56-68 de la protéine Nef (50 µg/ml) en présence des cellules dendritiques (DC) obtenues parallèlement (1.10^6 /ml).

Les inventeurs ayant pu montrer que la congélation n'affecte pas la fonctionnalité des cellules dendritiques, les cellules dendritiques restantes sont congelées et utilisées pour la première restimulation par le peptide Nef 56-68 qui a lieu quinze jours après l'immunisation.

Pour les restimulations ultérieures, les cellules dendritiques sont en général remplacées, notamment au-delà de la deuxième restimulation, par les cellules B du donneur, isolées à partir du même prélèvement par déplétion des cellules CD4⁻ en cellules CD8⁺ (Système Macs, Milteny

Biotech). Toutefois, des cellules dendritiques congelées peuvent être utilisées dans toutes les restimulations, pour autant qu'on en ait des quantités suffisantes.

Le schéma 1 qui suit résume les différentes étapes d'obtention, à partir du sang complet, des différentes cellules utilisées : cellules dendritiques, lymphocytes T CD4⁺ et cellules B.

Schéma 1

10

15

20

25

30



Ficoll

VarioMacs

Cellules CD14⁺
+ IL-4 + GM-CSF

Cellules CD14-

5 jours

VarioMacs

Cell.
Dendritiques

Cell. CD4⁺

Cell. CD4-

Cell. CD8⁺

Cell. CD8-

VarioMacs

= Cell. B

Dans les essais récapitulés dans le tableau qui suit, l'obtention de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 se résume comme suit :

10

Immunisation in vitro (I)

Cellules CD4⁺ + cellules dendritiques + peptide
Culture : 15 jours

5 1ère Restimulation (1S)

Cellules CD4⁺ + cellules dendritiques + peptide
Culture : 15 jours

2ème Restimulation (2S)

10 Cellules CD4⁺ + cellules dendritiques ou B + peptide
Culture : 15 jours

3ème Restimulation (3S)

15 Cellules CD4⁺ + cellules B + peptide
Culture : 15 jours

2- Résultats.

La production de cytokines et l'induction d'anergie (non-réponse) ont été examinées.

20

a) Production de cytokines.

La production d'IFN-γ, d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-5 a été recherchée dans les surnageants de culture des lymphocytes T CD4⁺ 24 h et 48 h après l'immunisation *in vitro* (I) et après les restimulations successives (1S, 2S et 3S) par le peptide 56-68 de la protéine Nef, en utilisant une méthode ELISA.

Les résultats montrent clairement une orientation de type TH 1 de la réponse obtenue, avec des productions importantes d'IFN-γ et/ou d'IL-2 mais jamais d'IL-4 ou d'IL-5, et ceci quel que soit le génotype DR du prélèvement.

b) Induction d'anergie.

On constate, selon le cas, dès la deuxième ou la troisième restimulation par le peptide, une forte diminution, voire le plus souvent une disparition de la production d'IFN-γ et/ou d'IL-2.

Il semble donc que la réponse optimale est obtenue après la deuxième présentation du peptide (1ère restimulation) et que des restimulations répétées ont tendance à anergiser les lymphocytes T CD4 préparés dans cet 5 exemple.

Dans ces conditions, la réinjection des cellules au patient doit avantagusement avoir lieu après l'incubation qui suit la 1ère restimulation, soit environ après un mois de culture.

10 Les inventeurs ont démontré qu'après immunisation *in vitro* par le peptide 56-68 de la protéine Nef, on génère très rapidement (sous 10 jours) des cellules T CD4⁺ présentant un phénotype de cellules mémoires effectrices produisant de l'IFN-γ après restimulation par le peptide 56-15 68 de Nef. Ce phénotype est donné sur la base d'une diminution des marqueurs CD45RA (caractérisant les cellules T naïves) et CD62Ligand (récepteur de homing des cellules T) et d'une augmentation du marqueur CD45RO (caractérisant les cellules T mémoires) qui atteint 36 % à J10.

20 Comme dans l'infection par le VIH, l'apparition de cellules CD4 mémoires spécifiques du virus est actuellement considérée comme un facteur de bon pronostic dans l'évolution de la maladie, cela renforce l'intérêt d'utiliser le protocole d'immunisation *in vitro* selon 25 l'invention, en utilisant le peptide 56-68 de la protéine Nef, à des fins de thérapie cellulaire chez des sujets infectés.

Il va de soi que pour un patient donné et un protocole donné différents facteurs peuvent intervenir dans 30 l'obtention de la réponse optimale recherchée, en particulier en ce qui concerne le moment où elle intervient. Un suivi *in vitro* des résultats s'avère donc recommandé, voire nécessaire dans chaque cas.

TABLEAU DES RESULTATS

Essai n°	Typage	Nbre de restimula- tions	Stades d'apparition d'une réponse			
			IL-4	IL-5	IL-2	IFN-Y
1	DR1/DR1	5	Non	Non	I	I, 1S, 2S, 3S
2	DR4/DR13	3	Non	Non	I, 1S	I, 1S, 2S
3	DR3/DR4	2	Non	Non	1S	Non
4	DR15/DR3	3	Non	Non	Non	I, 1S, 2S, 3S
5	DR3/DR11	1	Non	Non	Non	I
6	DR13/DR8	1	Non	Non	I	I, 1S
7	DR4/DR13	2	Non	Non	I	I, 1S, 2S
8	DR4/DR7	1	Non	Non	I	I, 1S
9	DR3/DR11	2	Non	Non	Non	Non
10	DR15/DR4	3	Non	Non	1S	I, 1S
11	DR15/DR13	3	Non	Non	I, 1S, 3S	I, 1S, 2S
12	DR7/DR9	2	Non	Non	Non	I, 1S, 2S
13	DR1/DR3	3	Non	Non	1S	1S
14	DR3/DR11	3	Non	Non	Non	I, 1S

Exemple 2

On procède comme dans l'exemple 1 en utilisant le peptide 190-211 de la Sm 28 GST, Glutathion S Transferase de 28 kDa du parasite *Schistosoma mansoni*, appelé 5 Sm 28 GST 190-211 dont la séquence est :



Après immunisation *in vitro* et une restimulation, 10 les lymphocytes T CD4 ont une orientation de type TH1 (avec des productions importantes d'IFN- γ et/ou d'IL-2 mais jamais d'IL-4 ou d'IL-5) de la réponse obtenue, et ceci quel que soit le génotype DR du prélèvement.

Exemple 3

15 On procède comme dans l'exemple 1 en utilisant le peptide 830-846 de la toxine tétanique. Ce peptide est appelé TT 830-846. Sa séquence est :



20

Après immunisation *in vitro* et une restimulation, les lymphocytes T CD4 ont une orientation de type TH1 (avec des productions importantes d'IFN- γ et/ou d'IL-2 mais jamais d'IL-4 ou d'IL-5) de la réponse obtenue, et ceci quel que 25 soit le génotype DR du prélèvement.

Exemple 4

On procède comme dans l'exemple 1 en utilisant le peptide 307-319 de l'hémaglutinine du virus Influenza. Ce peptide est appelé HA 307-319. Sa séquence est :

30



Après immunisation *in vitro* et une restimulation, les lymphocytes T CD4 ont une orientation de type TH1 (avec 35 des productions importantes d'IFN- γ et/ou d'IL-2 mais jamais d'IL-4 ou d'IL-5) de la réponse obtenue, et ceci quel que soit le génotype DR du prélèvement.

Les exemples 2 à 4 montrent que le procédé qui a été décrit en détail à propos du VIH peut être généralisé aux infections dues à d'autres virus, aux bactéries et aux parasites.

5 Les inventeurs ont démontré que malgré cette généralisation du procédé, le répertoire T (déterminé sur la base de l'expression des régions V β éta du récepteur T) exprimé par la cellule T CD4 induite était spécifique du peptide utilisé pour l'immunisation *in vitro*.

10 Ainsi, les clones T dérivés après immunisation *in vitro* et une restimulation par le peptide 56-68 de la protéine Nef présentent tous un profil de réponse TH1 et une expression préférentielle de V β 6.1. En revanche, les clones dérivés, dans les mêmes conditions, avec le peptide de 15 l'exemple 3 (peptide 830-846 de la toxine tétanique) ou de l'exemple 4 (peptide 307-319 de l'hémaglutinine du virus Influenza), s'ils présentent tous un profil de réponse Th1, expriment un répertoire différent : respectivement V β 5 pour l'exemple 3 et V β 2 pour l'exemple 4, ce qui confirme le 20 caractère peptide-spécifique de la réponse induite.

En conclusion générale, la présente invention permet de générer très rapidement des cellules CD4 TH1, spécifiques, productrices d'IFN- γ , présentant un phénotype de cellules mémoires et ceci quel que soit le génotype HLA 25 du donneur.

Par conséquent, ces cellules peuvent être utilisées dans des protocoles de thérapie cellulaire, par transfert adoptif dans les 10 jours suivant l'immunisation *ex vivo*, dans toutes les pathologies où ce type de cellules 30 a été décrit comme protecteur et en particulier dans l'infection par le VIH (notamment par la génération de cellules spécifiques du peptides 56-68 de la protéine Nef).

REVENDICATIONS

1.- Lignée de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 induisant, de manière efficace, des lymphocytes T cytotoxiques, c'est-à-dire une réponse CD8 efficace, contre 5 une infection provoquée par un agent infectieux tel qu'un virus, une bactérie ou un parasite.

2.- Procédé d'induction *ex vivo* d'une lignée de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 selon la revendication 1, lequel procédé comprend essentiellement les 10 étapes consistant à :

- a) prélever sur un donneur un échantillon biologique contenant des lymphocytes T ;
- b) isoler les lymphocytes T CD4⁺ à partir de l'échantillon prélevé à l'étape a) ; parallèlement
- c) se procurer des cellules dendritiques isolées à partir du même échantillon ou d'un autre échantillon provenant du même donneur ;
- d) soumettre les lymphocytes T CD4⁺ isolés à l'étape b) à une réaction immunologique ou immunisation *in vitro* avec 20 un peptide d'une protéine de l'agent infectieux présentant au moins un épitope T, de préférence un épitope T et un épitope B, en présence des cellules dendritiques de l'étape c) ;
- e) effectuer au moins une restimulation, de préférence de 25 une à trois restimulations, dans les mêmes conditions que l'immunisation, en remplaçant éventuellement les cellules dendritiques par des cellules B du même donneur.

3.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé 30 en ce que l'échantillon biologique est un échantillon de sang, de préférence périphérique.

4.- Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que l'agent infectieux est le VIH.

5.- Procédé selon la revendication 4, caractérisé 35 en ce que la protéine est une protéine de régulation du VIH.

6.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé

en ce que le peptide est le peptide 56-68 de la protéine Nef de régulation du VIH.

7.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que les lymphocytes T CD4 sont cultivés avant la première restimulation et ensuite entre deux restimulations successives pendant environ quinze jours à chaque fois.

8.- Lignée de lymphocytes T CD4 spécifiques de type TH1 obtenus à partir du sang d'un donneur et induisant, de manière efficace, des lymphocytes T cytotoxiques, c'est-à-dire une réponse CD8 efficace, contre une infection provoquée par un agent infectieux tel qu'un virus, une bactérie ou un parasite, pour le traitement immunoprophylactique ou thérapeutique dudit donneur.

9.- Lignée selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'agent infectieux est le VIH.